

原 著

PCR-SSCP法による p53遺伝子変異の検出についての基礎的検討

長谷川 秀 浩* 五十嵐 俊 彦*

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたDNAを用いて、p53遺伝子変異の検出をPCR-SSCP法で検討し、その検出条件を確立した。すなわち、p53遺伝子の増幅には抽出されたDNAの性状が深く関与するため、DNAの抽出方法として可能な限り夾雑物を除去し、濃縮された純粋なDNAを用いることが必須である。また、SSCP法においてはゲルの分離能力を向上させることと、高い検出感度を持つ銀染色を組み合わせる必要があると判断された。本法により検出されたp53遺伝子変異の情報は、癌の診断分析において、その意義は極めて大きいものと期待できる。

キーワード：PCR、PCR-SSCP、P53遺伝子変異、ホルマリン固定パラフィン包埋組織

緒 言

分子生物学の発展により、多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子が単離され発癌におけるメカニズムが解明され現在、その技術が病理診断学に応用されはじめている。中でも、癌抑制遺伝子として働くp53遺伝子から発現した蛋白質は、通常、細胞の腫瘍性増殖を抑える働きをしている。が、環境因子や加齢により後天的にDNAの損傷が積み重なった場合や突然変異によりp53遺伝子が不活化されることが発癌の原因とされ、また、p53の変異や欠失を示す悪性腫瘍はより予後不良であることが報告されている。¹⁾さらに、多重癌への応用も考えられている。すなわち、臓器に複数の癌が同時に発生し、その組織型が同一の場合、その起源が転移性か、または、そのいずれもが原発性の多重癌であるかを組織学的に正確に鑑別することは極めて困難である。そのとき、癌細胞から得られたp53遺伝子の変異の位置を具体的に知ることにより、同時多発性か、転移性かを判断する材料²⁾になるだけでなく、その解析結果は予後の推測という臨床に直結した情報を与えてくれる。PCR法を用いたDNA変異の検出法としてPCRダイレクトシーケンス法、PCR-RFLP法、蛍光色素やRIで標識されたプライマーを用いたPCR-SSCP法などがあるが、特別な装置が必要とされたり、DNAの変異が制限酵素の認識配列内にはない場合には検出できないなど、一般的な遺伝子変異検出のためのスクリーニング法とは考えにくい。今回我々は、通常の検査室で容易に実施できるp53遺伝子の突然変異の検出法として、その基礎的検討を行ないグリセロール添加ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行なった後、増感目的として銀染色を施すことによる通常のPCR-SSCP法での検出の可能性について検討したので報告する。

材料および方法

A. 材料

検討症例は、1998年に大腸腺癌摘出後、2000年11月の定期検診にて、肺の異常陰影を指摘された。肺生検の病理検査の結果腺癌と診断され、組織型が同一のため大腸癌の転移が疑われた。本症例のそれぞれの組織について検討した。

B. 方法

1. パラフィン包埋組織からのDNAの抽出

ヘマトキシリン・エオジン染色を施したそれぞれの標本を顕微鏡で確認しながら、できる限り病変部だけを15 μ m厚の切片として採取した。DNAの抽出方法は、(1)市販のDNA抽出キットにより回収されたDNA材料と、(2)型の如く、キシレンによる脱パラフィン、ProtenaseKとSDSにより蛋白質を溶解、フェノール/クロロホルムにてDNAを抽出し、エタノール沈殿し回収したDNA材料と、(3)(2)と同方法により得られたDNAをさらにDNA Clean & ConcentratorTM (フナコシ)を用いて夾雑物を除去したDNA材料と、これら3者間におけるPCRによる増幅効率の比較をおこなった。また、コントロール用DNAは、ホルマリン固定パラフィン包埋された正常胃粘膜を同様の方法にて処理し採取されたものを用いた。

2. プライマーの設定とPCR-SSCP条件

プライマーは、エキソン5~8のエキソン-イントロン境界部に設定し、その塩基配列をFig.1に、反応液の組成とPCR反応条件をFig.2にそれぞれ示した。なお、反応条件についてはアニーリングの温度、増幅回数など個々のプライマーにより異なるため、それぞれの至適条件を検討し設定した。試薬はAmpli Taq Gold 8 (Applied Biosystems)、装置はプログラム テンプ コントロールシステムPC701 (Astec)を使用した。PCR終了後、3 μ lのPCR産物と7 μ lのゲルローディングバッファー(0.05%BPP、0.05%XC、ホルムアミド溶液)を混合し、90 $^{\circ}$ C、10分熱変性後、直ちに氷上で10分間急冷した。熱変性したサンプル10 μ lを、5%グリセロール添加12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、4 $^{\circ}$ C環境下において、10

exon 5	Forward	5'- ttc ctc ttc cta cag tac toc -3'
	Reverse	5'- gcc cca gct gct cac oat cg -3'
exon 6	Forward	5'- cac tga ttg ctc tta ggt ctg -3'
	Reverse	5'- agt tgc aaa cca gac ctc agg -3'
exon 7	Forward	5'- gtg tta tct cct agg ttg gc -3'
	Reverse	5'- oaa gtg gct cct gac ctg gag -3'
exon 8	Forward	5'- cct atc ctg agt agt ggt aat -3'
	Reverse	5'- gtc ctg ctt gct tac ctc gc -3'

Fig 1. Primer sequences of p53 gene amplification.

*〒940-0864 新潟県長岡市川崎1丁目2520番地 1 厚生連病理センター

(1) Reaction medium	
d-H ₂ O	: 14.8 μ /
$\times 10$ Buffer with MgCl ₂ (MgCl ₂ 1.5mM)	: 2.5 μ /
2mM dNTP	: 2.5 μ /
20pM forward primer	: 1.0 μ /
20pM reverse primer	: 1.0 μ /
AmpliTaq Gold	: 0.2 μ /
Sample	: 3.0 μ /
Total	: 25.0 μ /

(2) Cycle condition

Each three steps as follows:

exon 5	1. 96°C \times 10'	exon 6	1. 96°C \times 10'
	2. 45cycles		2. 40cycles
	94°C \times 30"		94°C \times 30"
	57°C \times 30"		60°C \times 30"
	72°C \times 30"		72°C \times 30"
	3. 72°C \times 20'		3. 72°C \times 20'
exon 7	1. 96°C \times 10'	exon 8	1. 96°C \times 10'
	2. 42cycles		2. 41cycles
	94°C \times 30"		94°C \times 30"
	60°C \times 30"		55°C \times 1'
	72°C \times 30"		72°C \times 30"
	3. 72°C 20'		3. 72°C \times 20'

Fig 2. The reaction medium and cycle condition for PCR.

mAの定電流、15時間の電気泳動を行なった。泳動後、(a) 2 μ g/mlエチジウムブロマイド (EtBr) 染色および、(b) Silver stain plus kit (BIO-RAD) にて銀染色を施し、それぞれの分離パターンを、観察比較した。

結果

それぞれの抽出方法により回収されたDNAについて、P53 exon~8を認識する各プライマーを用いてPCRによる増幅効率の検討を行なった。その結果、抽出キット (方法1-(1)) および通常の方法 (方法1-(2)) により回収されたDNAを用いた場合、その増幅効率は極めて悪く、そのPCR産物をポリアクリルアミドにて電気泳動後、EtBr染色行なっても目的領域の増幅を示すバンドが検出されなかった。しかし、通常の方法により回収後、夾雑物を除去し濃縮操作を施したDNAを用いた場合 (方法1-(3))、壊死組織が混入された組織や肺生検材料のような少量のサンプルからでも効率よく確実に増幅することが可能であった。さらに、その再現性も極めて良好であったとともに、非特異的な増幅は確認されなかった。ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、EtBrにより染色を行なった結果をFig.3に示す。

PCR-SSCP法により分離されたP53 exon 5の電気泳動後、EtBr染色と銀染色を施した結果を比較すると (Fig.4)、銀染色では一本鎖DNAにより形成された高次構造がバンド状に分離していることが確認されたが、EtBr染色を行なった場合では分離されたバンドを確認することができなかった。p53 exon 6の電気泳動後、銀染色を行なった実際の結果をFig.5に示し

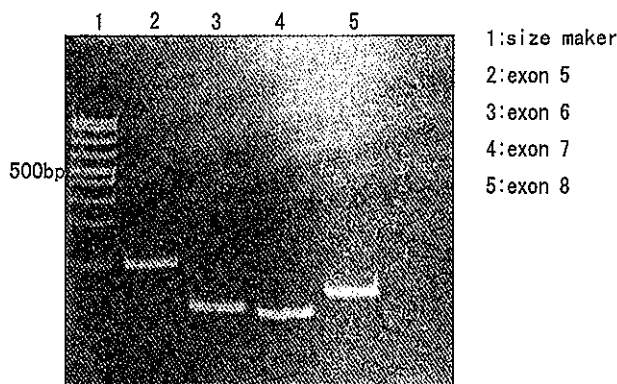


Fig 3. Amplification of the p53 gene by PCR method.

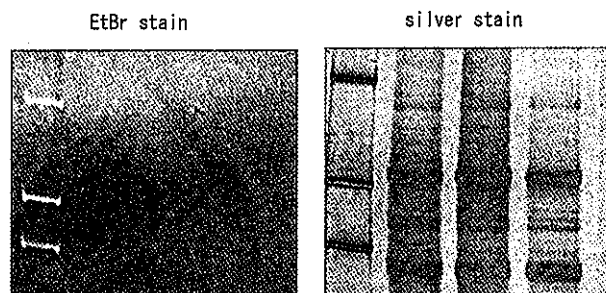


Fig 4. Comparison of the staining positivity.

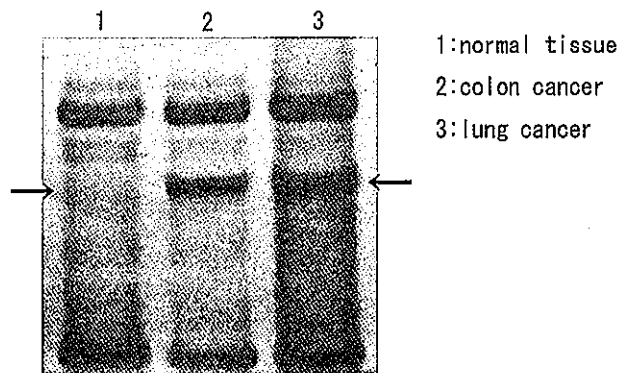


Fig 5. Detection of the gene mutation in p53 exon 6.

た。正常遺伝子由来のバンドのほかに点突然変異を示すバンドが大腸および肺の病巣部分から採取されたDNAに確認され、かつ変異を示している位置が同一であったことより、今回、検討材料に用いた肺腺癌は大腸腺癌の転移であることが強く示唆された。

考察

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から回収されたDNAサンプルから効率的かつ確実にPCRによるDNAの増幅を行なうためには、その反応を阻害するような夾雑物を除去し、その純粋なDNAを濃縮することが必要であった。Taq Polymeraseの選定がその増幅効率に対し深く影響する³⁾との報告があるが、純粋なDNAの精製も同時にその必須条件であると判断された。PCR-SSCP法による遺伝子変異の検出には、電気泳動による分離条件を改良することが重要である。一般にPCR-SSCP法の電気泳動は比較的泳動距離が長いことから高電圧をかけて

行うが、その際発生する熱の影響によりホルムアミドの存在下で一本鎖性高次構造を形成しているDNAが再び二本鎖に結合してしまうことにより明瞭に分離できなくなる可能性がある。したがって、通常は冷却装置のついた泳動装置でおこなわれるが、今回我々は、一般の冷蔵庫内で10mAという比較的弱い電流で長時間の泳動を行なうことにより、発熱による悪影響を回避した。また、一般にPCR-SSCP法に用いられるゲルは、硬度を調整した既成のグラングェントゲルやプレキャストゲルが用いられることが多いが、いずれも専用の泳動装置が必要とされる。我々は、通常のポリアクリルアミドゲルに5%の割合でグリセロールを添加することによりゲルの分離能力を向上させ⁴⁾、かつ、高い検出感度をもつSilverstain plus kit⁵⁾を用いて染色を行なうことにより、p53遺伝子変異の検出を可能にした。我々の方法は、特別な装置を必要とすることがなく、通常の検査室で容易にPCR-SSCP法を実施可能とした。同時に、本法により解析されたp53遺伝子の解析結果は、癌診断のための補助的手段⁶⁾として用いられるだけでなく、予後の推測や、多重癌か再発・転移であるかを判断するための貴重な情報を与えてくれるものと考えられる。また、パラフィン包埋組織から得られたDNAを用いての解析が可能であるということは、患者病歴を振り返り再検討するうえで、プレバート上において病変部を確実に把握できることから、組織、細胞のレベルでの正確な情報を過去にさかのぼって提供してくれることを意味するものであり、その利用価値は極めて大きいものと期待できる。

結 語

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたDNAを用いてp53遺伝子を増幅するには、PCRを阻害するような夾

雑物を除去し、純粋なDNAの精製と濃縮が極めて重要な条件であると判断された。また、PCR-SSCP法によるp53遺伝子変異の検出には、グリセリンを加え分離能力を向上させたポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行ないさらに、高い検出感度をもつ銀染色を施すことが有効な手技であると判断された。

参考文献

- 1) Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T et al. Prognostic significance of p53 mutations and deletion in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1993; 53: 1-4.
- 2) Oda T, Tsuda H, Scarpa A et al. Mutation pattern of the p53 gene as a diagnostic maker for multiple hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 1992; 52: 3674-3678.
- 3) 上野一郎 他. p53遺伝子変異における免疫染色法と簡易PCR-Cold SSCP法の検出の比較. *臨床病理* 2000; 48: 469-472.
- 4) 改訂 PCR Tips: 細胞工学 別冊, 112, 秀潤社 東京, 1999.
- 5) 大藤道衛, 湯浅保仁. 銀染色とグラングェントゲルを用いたnon-RI PCR-SSCP法. *生化学*1993; 65: 35-38.
- 6) Masato Y et al. Correlation between genetic alterations and histopathological subtypes in bronchiolo-alveolar carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Pathol. Int.* 2000; 50: 778--785.

Original article

Detection analysis of the p53 genomic mutations by PCR-SSCP method.

Hidehiro Hasegawa* and Toshihiko Ikarashi*

This study was conducted to establish the detection of p53 genomic mutations by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism method (PCR-SSCP). DNA samples were extracted from the formalin fixation and paraffin embedded tissues. It was necessary to condense and purify DNA for PCR-SSCP method. It was needed to improve the separation ability of polyacrylamide gel and the silver staining was useful for the improvement of detection sensitivity in SSCP method. p53 genomic mutations were easily confirmed by our method and becomes a reliable maker for the diagnosis and analysis of cancer.

Key words : Polymerase chain reaction (PCR), polymerase chain reaction- single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), p53 genomic mutations, Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue

*Kouseiren Byouri Center
Kawasaki 2520-1, Nagaoka, Niigata 940-0864